

## Uji Aktivitas Ekstrak Daun Pepaya (*Carica papaya*. LINN) sebagai Antimalaria *in vitro*

### *In Vitro Activities Test of Papaya Leaf Extract (Carica papaya. LINN) as an Antimalaria Agent*

Johanis F Rehena

*Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Pattimura*

#### ABSTRACT

Based on WHO's estimation, there are at least 300-500 million people in the world infected by Malarian disease every year, 110 million people show the symptom, and 2.7 million people died. People who suffer from malaria in Kairatu regency are 1.296 people. Therefore, the invention of Malarian medicines is hoped to provide new medicine with mechanism and potential target and safe for the society. The objective of this study is to find out the role of extracted papaya's leaf Cibinong and Solo Variety as antimalaria. The method is laboratory experimental, which is the sample of papaya's leaf about 400 gram taken from Kairatu regency Maluku Province. Parasite used is *Plasmodium falciparum* strain G2300. antimalaria activity test *in vitro* is done toward the result of extracted papaya's leaf dissolved in DMSO then it is done on flat titer with 24 holes. With level of parasitemia 1% and hematokrit 5%, and then is counted the percentage of parasitemia and growth percentage. Antimalaria test result on papaya's leaf Cibinong variety with probit program show the value of  $IC_{50}$ , 2.7821nanog/ml and Solo variety of Papaya is  $IC_{50}$ , 2.14279, in other word, that cibinong variety and solo *in vitro* is active as an antimalaria.

Keywords: Test activity anti-malaria, papaya leaf, *in vitro*

#### PENDAHULUAN

Berdasarkan taksiran WHO, didapatkan 300-500 juta orang di dunia terinfeksi malaria setiap tahunnya, 110 juta orang menunjukkan gejala, dan 2,7 juta diantaranya mengalami kematian. Pada tahun 2005 penderita malaria di Kabupaten Seram Bagian Barat mencapai 7.760 orang dan di Kecamatan Kairatu sebanyak 1.296 orang, dengan prevalensi 2,42% (Dinkes Seram Bagian Barat 2006). Angka kesakitan malaria di daerah Maluku setiap tahun, disebabkan karena kondisi geografis Maluku yang merupakan daerah pesisir dan banyaknya daerah rawa. Berdasarkan informasi dari Subdinas Pemberantasan Penyakit Menular dan Penyehatan Lingkungan Propinsi Maluku, sebagian besar daerah-daerah di Maluku termasuk daerah endemis malaria tinggi, dengan angka temuan kasus antara 57 kasus per 1000 jiwa setiap tahunnya.

Penemuan obat-obat antimalaria diharapkan dapat menyediakan obat baru dengan mekanisme dan target obat yang potensial dan aman bagi manusia. Target obat potensial yang disarankan untuk dikembangkan berhubungan dengan hambatan pada struktur organel parasit, antara lain pemecahan sel protein host, transporter parasit, organel

plastida, biosintesis isoprenoid, kontrol siklus sel, fungsi mitokondria, dan biosintesis membran (Ridley 2002; Biagini 2003). Mursito (2002) menjelaskan bahwa pepaya merupakan tanaman dengan ketinggian mencapai 15 meter. Daun, buah, dan akar pepaya dapat digunakan sebagai obat. Daun muda dapat dipergunakan untuk pengobatan penyakit demam, penambah nafsu makan, keputihan, jerawat, menambah air susu, serta mengobati sakit gigi. Dalam beberapa dekade terakhir, ekstrak pepaya digunakan untuk memerangi penyakit kanker (Sukardiman 2006).

Pepaya juga menjadi bahan perawatan terkenal bagi penduduk Aborijin Australia untuk membantu persalinan, mengendalikan kelahiran dalam beberapa kasus di Papua New Guinea, dan sebagai alat kontrasepsi. Dalam daun pepaya terkandung senyawa alkaloid karpain, caricaksantin, violaksantin, papain, saponin, flavonoida, politenol, dan saponin. Daun pepaya juga mengandung protein tinggi, lemak, vitamin, kalsium (Ca) dan zat besi (Fe) yang berfungsi sebagai pembentukan hemoglobin (Tietze 1997).

Menurut Rukmana (1995) pepaya varietas Cibinong buahnya berbentuk panjang, besar dan lancip pada bagian ujung. Daging buah masak berwarna merah kekuningan, agak keras

dan cukup manis beraoma. Bentuk dan ukuran pepaya Cibinong jauh berbeda dengan varietas Solo dan Jinggo karena buahnya panjang dan besar, bentuk buah membesar dari pangkal ke bagian tengah buah kemudian melancip kebagian ujung buah, kulit buahnya kasar, dan biasanya masak dari bagian ujung, sedangkan bagian pangkal tetap berwarna hijau dan lama untuk berubah menjadi kuning. Daging buah berwarna merah kekuningan dan rasanya kurang manis, berat buah mencapai 2,5–6 kg/buah. Varietas ini dikembangkan sebagai pepaya unggul sejak tahun 1983 oleh Pusat penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan (Kalie 2006).

Uji aktifitas antimalaria ekstrak tanaman dengan cara *in vivo*, menggunakan parasit *Plasmodium berghei* dimaksudkan sebagai suatu pembelajaran interaksi parasit dengan hospes, pengembangan vaksin dan pengujian obat, hal ini didasarkan atas beberapa faktor antara lain, terdapat kemiripan dasar biologi dari parasit rodensia dengan parasit manusia, kemiripan karakteristik molekul untuk sensitivitas dan resistensi obat dari parasit manusia, serta proses infeksi mudah dan aman dalam pelaksanaan. Pengujian dimaksud untuk mengetahui peran ekstrak daun pepaya varietas Solo dan varietas Cibinong terhadap hambatan pertumbuhan parasit *Plasmodium berghei* dengan melihat dosis yang efektif.

## METODE

Metode eksperimen laboratorium digunakan dalam penelitian ini dengan subjek ekstrak pepaya varietas Cibinong sebanyak 400 gram yang diambil di Wilayah Kecamatan Kairatu Kabupaten Seram Bagian Barat.

Alat dan bahan ekstrak, timbangan, pompa vakum, corong Bucher, kertas saring, rotavator, wadah untuk rebusan, wadah tempat rendaman etanol, beker gelas, hot plate, batang pengaduk, gelas ukur, dan termometer. Pipet Pasteur, *blue tip*, *yellow tip*, *culture tube*, autoclaf, oven, botol laborat (Scott-Duran), tabung sentrifuse bertutup (Falcon), pipet mikro (Socorex dan Ependorf), pinset, lampu spiritus, *Laminar Air Flow* (LAF/clean bench), mikroskop (Olympus CH-20), gelas obyek, *disposablesyringe*, lemari pendingin, inkubator, desikator, lilin, penyaring membran ukuran 0,22 µm, sentrifuse dingin, petridish, pompa hisap, stirer, dan *water bath*. Bahan pelarut lainnya adalah, Etanol 96% teknis (2 ltr) dan aquades (1.600 ml). Suspensi parasit *Plasmodium Falciparum* strain G2300 dari Laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya yang diperoleh dari Laboratorium Malaria, Lembaga Biologi Molekuler

Eijkman, Jakarta. Kadar parasitemia suspensi sel untuk uji antiplasmodial *in vitro* adalah 1%. Suspensi sel parasit tersebut dibuat dari biakan *Plasmodium falciparum*. NaCl (Merck), antikoagulan CPD (*Citrate Phosphate Dextrose*) dengan adenin, RPMI 1640, HEPES buffer, NaHCO<sub>3</sub>, hypoxanthine (Merck), gentamisin sulfat (Sigma), serum dan sel darah manusia golongan O, *aquadest steril for irrigation* (Otsuka), larutan pewarna Giemsa (Merck), dapar fosfat, dan minyak imersi.

Isolat beku *Plasmodium falciparum* strain G2300. Medium kultur malaria lengkap (MCM) yaitu: RPMI 1640, HEPES buffer, NaHCO<sub>3</sub>, hypoxanthine (Merck), gentamisin sulfat (Sigma), serum dan sel darah manusia golongan O, *aquadest steril for irrigation* (Otsuka), DMSO (Sigma). Artemisin, Larutan steril dari 10,4 g RPMI-1640, 5,96 g HEPES, 2,1 g Natrium Bikarbonat, 0,05 g Hypoxantin, 0,5 ml Getamycin dan aquabides 960 ml. Larutan ini disterilisasi dengan filter berdiameter 0,22 µm, dimasukkan dalam botol dan disimpan pada suhu 4°C. Larutan ini merupakan medium pencuci dan bila digunakan dimasukkan dalam inkubator pada suhu 37°C. Darah manusia golongan O dan diendapkan selama 1 jam, kemudian disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Serum diambil dengan pipet Pasteur dan diinaktivasi pada suhu 56°C selama 30 menit. Penyimpanan pada suhu -20°C dan bila akan digunakan, dihangatkan pada suhu 37°C.

Serbuk daun pepaya kering yang ditimbang sebanyak 100 gram untuk varietas pepaya Solo dan 100 gram varietas Cibinong, dimaserasi dengan pelarut etanol 96% teknis masing-masing 500 ml selama 24 jam (1 hari perendaman) sambil sekali-kali diaduk. Ekstrak disaring dengan corong *Buchner* atau pompa vakum untuk mendapat filtrat. Residu dimaserasi ulang dengan etanol 500 ml sebanyak 4 kali. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan rotavator sampai diperoleh ekstrak kental. Hasil ekstrak kental dituangkan pada wadah kecil dan dikeringkan dalam oven selama beberapa hari untuk diuji lebih lanjut.

## Uji *in vitro*

Prosedur biakan ini didasarkan pada metode Trager & Jensen (1976). Biakan dilakukan pada cawan petri dan dikerjakan secara aseptik. Parasit *Plasmodium falciparum* strain G2300 yang sensitif terhadap kloroquin, diperoleh dari simpanan beku yang di *thawing*.

Tabung yang berisi parasit beku dicairkan pada suhu 37°C. Ditambahkan dengan volume yang sama NaCl 3,5% dan dipindahkan ke tabung sentrifus menggunakan pipet Pasteur sambil dicampur perlahan. Kultur disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Supernatan kemudian dibuang. Endapan disuspensikan dengan 5 ml medium tak lengkap, dicampur perlahan-lahan dengan pipet pasteur kemudian disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C.

Supernatan kemudian dibuang. Prosedur ini dilakukan sebanyak 2 kali.

Setelah endapan dicuci, ditambahkan medium lengkap dan eritrosit 50% dicampur perlahan menggunakan pipet (hematokrit 5%). Kultur dipindahkan ke dalam cawan Petri, dimasukkan dalam *candle jar* dan selanjutnya disimpan di dalam inkubator yang bersuhu 37°C. Selanjutnya dilakukan penggantian medium setiap hari. Bila tingkat parasitemianya lebih dari 5% dapat dilakukan subbiakan.

Uji aktivitas antimalaria *in vitro* dilakukan terhadap hasil ekstraksi daun pepaya yang dilarutkan dalam DMSO kemudian dilakukan pada lempeng multi titer datar dengan 24 lubang. Pengujian dilakukan pada kultur parasit dengan tingkat parasitemia 1% dan hematokrit 5% dengan duplikasi percobaan. Setelah diinkubasi selama 48 jam, kultur dipanen dan dibuat sediaan lapisan darah tipis dengan pewarnaan Giemsa 10%, didiamkan selama 15 menit, dicuci dengan air dan dikeringkan, kemudian dihitung persentase parasitemia dan persentase pertumbuhan *Plasmodium falciparum* dan hambatannya, dengan menghitung jumlah eritrosit yang terinfeksi setiap 1000 eritrosit di bawah mikroskop. Rumus yang dipakai untuk menghitung parasitemia, pertumbuhan *Plasmodium falciparum* dan hambatannya sebagai berikut:

1. Persentase parasitemia dihitung dengan rumus (Maximus 2005):

$$\% \text{Parasitemia} = \frac{\sum \text{eritrosit yang terinfeksi}}{1000 \text{ eritrosit}} \times 100\%$$

2. Persentase penghambatan dihitung dengan rumus

$$\% \text{ Penghambatan} = 100 \% \times 100 \frac{X_p}{X_k}$$

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil ekstraksi etanol daun pepaya varietas varietas Cibinong melalui proses maserasi/rendaman etanol menunjukan pewarnaan hijau-kecoklatan yang diperlihatkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil ekstraksi etanol daun pepaya.

Varietas	Berat bahan	Warna	Jumlah (ml)
Cibinong	100 gram	Hijau	500
Solo	100 gram	Kecoklatan	500
		Hijau	
		Kecoklatan	

Hasil rotavapor kemudian dituangkan pada wadah kecil dan ditimbang hasilnya, kemudian

dikeringkan dan disimpan pada oven untuk pengamanan kontaminasi jamur. Hasil rotavapor terlihat pada Tabel 2. Tabel 2 menunjukkan hasil rotavapor ekstrak etanol varietas Cibinong sebesar 8,8 gram. Persen parasitemia, persen pertumbuhan dan hambatan *Plasmodium falciparum* strain G2300 dari paparan ekstrak etanol varietas Cibinong dan varietas Solo diperlihatkan pada Tabel 3 dan Tabel 4.

Tabel 2. Hasil rotavapor.

Varietas	Berat bahan sebelum Rotavapor (ml)	Berat wadah (gr)	Berat wadah + Berat bahan (gr)	Hasil (gr)
Cibinong	500	46,7	55,5	8,8
Solo	500	46,7	55	8,3

Data hasil perhitungan pada Tabel 3, memperlihatkan persen parasitemia *Plasmodium falciparum* strain G2300 yang dipapar dengan ekstrak etanol daun pepaya varietas Cibinong selama waktu inkubasi 48 jam, menunjukkan peningkatan parasitemia pada kontrol negatif dan mengalami penurunan persen parasitemia pada konsentrasi terkecil 0,01 µg/ml sampai dengan konsentrasi 100 µg/ml.

Selanjutnya persen pertumbuhan *Plasmodium falciparum* strain G2300 tertinggi pada kontrol negatif dengan nilai rata-rata 5,83 % dan nilai persen pertumbuhan menurun pada perlakuan konsentrasi 0,01 µg/ml dengan nilai rata-rata sebesar 5,36%, 0,1 µg/ml 7,89%, 1 µg/ml 4,76%, 10 µg/ml 1,66%, dan konsentrasi 100 µg/ml nilai rata-rata 0,29%. Sedangkan persen hambatan pertumbuhan *Plasmodium falciparum* strain G2300 tertinggi pada konsentrasi 100 µg/ml dengan nilai rata-rata 95,12% dan persen hambatan menurun pada konsentrasi 10 µg/ml 71,53%, 1 µg/ml 18,36%, 0,1 µg/ml 10,3%, dan konsentrasi 0,01 µg/ml nilai rata-rata 8,15%.

Hasil uji aktivitas antimalaria dari daun pepaya varietas Cibinong dengan program probit menunjukkan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 2,78210µg/ml. Dari Tabel 4 tampak bahwa pertumbuhan rata-rata pada konsentrasi 100µg/ml sebesar 0,29% jika dibanding dengan rata-rata kontrol negatif 5,83%, sedangkan hambatan rata-rata pada konsentrasi 100 µg/ml sebesar 95,12% dan konsentrasi terkecil 0,01 µg/ml sebesar 8,15%. Nilai hambatan pertumbuhan *Plasmodium falciparum* strain

G2300 dari ekstrak daun pepaya varietas Cibinong berbeda dengan varietas Solo (97,09%) namun kedua varietas ini memiliki keunggulan sebagai penghambat pertumbuhan parasit *Plasmodium falciparum*. Hasil uji aktivitas antimalaria dari ekstrak etanol daun pepaya varietas Solo dengan program probit, menunjukkan bahwa ekstrak etanol varietas pepaya Solo  $IC_{50} = 2,14279 \mu\text{g/ml}$ .

Fidock (2004) & Kohler (2002) melaporkan bahwa suatu ekstrak yang memiliki efek antimalaria secara *in vitro* apabila memiliki nilai  $IC_{50}$  sebesar  $50 \mu\text{g/ml}$ , sedangkan pada tingkat fraksi  $IC_{50}$  lebih kecil dari  $25 \mu\text{g/ml}$ , dan isolat  $IC_{50}$  lebih kecil dari  $1 \mu\text{M}$ . Laporan dari Purwadaksi (2007) & Santoso (1998)

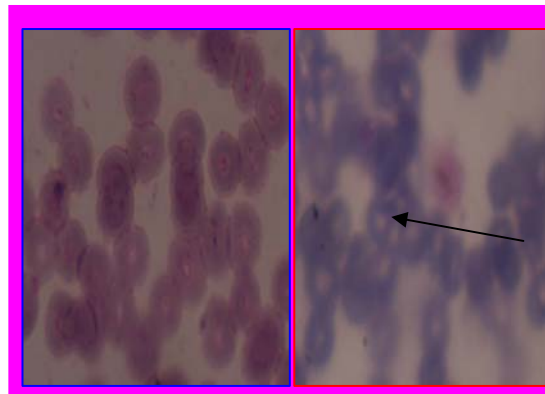
menunjukkan bahwa pada daun, bunga dan akar pepaya terdapat kandungan alkaloid carpaine, sehingga bila dikonsumsi rasanya pahit. Nuri (2005) menjelaskan bahwa senyawa flavonoid memiliki berbagai aktivitas farmakologis dan memiliki struktur kimia yang berbeda dengan obat-obat antimalaria lain. Obat-obat yang dengan struktur kimia yang berbeda sangat mungkin memiliki target obat yang berbeda. Gambar 1. diperlihatkan bentuk morfologi *Plasmodium falciparum* dari pembuatan slide sediaan darah tipis pewarnaan Giemsa pada stadium ring (cincin) yang menginfeksi eritrosit darah manusia golongan O yang diinkubasi selama 48 jam secara *in vitro*.

Tabel 3. Persen parasitemia, persen pertumbuhan dan persen hambatan *Plasmodium falciparum* Strain G2300 dari ekstrak Etanol daun pepaya varietas Cibinong.

Konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ )	R	% Parasitemia		% Pertumbuhan	Rata-rata	% Hambatan	Rata-rata
		0 jam	48 jam				
100 $\mu\text{g/ml}$	1	0,7	0,98	0,28	0,29	95,20	95,12
	2	0,7	0,99	0,29		95,03	
10 $\mu\text{g/ml}$	1	0,7	2,29	1,59	1,66	72,73	71,53
	2	0,7	2,43	1,73		70,33	
1 $\mu\text{g/ml}$	1	0,7	5,41	4,71	4,76	19,21	18,36
	2	0,7	5,51	4,81		17,50	
0,1 $\mu\text{g/ml}$	1	0,7	6,00	5,30	7,89	9,09	10,3
	2	0,7	5,88	5,18		11,51	
0,01 $\mu\text{g/ml}$	1	0,7	6,08	5,38	5,36	7,72	8,15
	2	0,7	6,03	5,33		8,58	
Kontrol -	1	0,7	6,68	5,98	5,83	-	-
	2	0,7	6,38	5,68		-	

Tabel 4. Persen parasitemia, persen pertumbuhan dan persen hambatan *Plasmodium falciparum* strain G2300 dari ekstrak Etanol daun pepaya varietas Solo.

Konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ )	R	% Parasitemia		% Pertumbuhan	Rata-rata	% Hambatan	Rata-rata
		0 jam	48 jam				
100 $\mu\text{g/ml}$	1	0,7	0,83	0,13	0,23	97,71	97,09
	2	0,7	0,90	0,20		96,47	
10 $\mu\text{g/ml}$	1	0,7	2,42	1,72	1,76	69,66	68,96
	2	0,7	2,50	1,80		68,25	
1 $\mu\text{g/ml}$	1	0,7	4,13	3,43	3,47	39,51	38,8
	2	0,7	4,21	3,51		38,09	
0,1 $\mu\text{g/ml}$	1	0,7	5,75	5,05	5,08	10,93	10,41
	2	0,7	5,81	5,11		9,88	
0,01 $\mu\text{g/ml}$	1	0,7	6,33	5,63	5,60	0,71	1,33
	2	0,7	6,26	5,56		1,94	
Kontrol (-)	1	0,7	6,41	5,71	5,67	-	-
	2	0,7	6,33	5,63		-	



Gambar 1. Struktur morfologi *Plasmodium falciparum* (bentuk ring) pada sedian darah tipis pewarnaan Giemsa yang dipapar ekstrak daun pepaya.

### KESIMPULAN

Hasil pengujian *in vitro* ekstrak etanol jauh lebih kecil dari batas ideal, sehingga dapat dikatakan ekstrak etanol daun pepaya varietas Cibinong dan varietas Solo secara *in vitro* aktif sebagai antimalaria.

### DAFTAR PUSTAKA

- Biagini GA, O'Neill, Nzila PM & Ward SA, 2003, *Antimalarial Chemotherapy: Young Guns or Back to the Future*, *Trends in Parasitology*, **19**(11): Dinkes Seram Bagian Barat. 2006. Laporan Kegiatan IRS dan MFS/MBS, Piru, Fidock DA, Rosenthal PJ, Croft SL, Brun R, Nwaka S. 2004. *Antimalarial Drug Discovery: Efficacy Models for Compound Screening*, *Review*, *Nature* 3 Juni.
- Kohler I, Siems J, Siems K & Hernandez MA. 2002. In Vitro Antiplasmodial Investigation of Medical Plants from El Salvador. *J. Bioscience*. **57**.
- Kalie B. 2006. *Bertanam Pepaya*. Jakarta. Penebar Swadaya.
- Maximus MT, Gunawan, Widayanti A, Nindatu M, Zaini NC, Dachlan YP & Sjafruddin. 2005. Aktivitas Antimalaria Ekstrak Metanol, Fraksi dan Isolat-Isolat dari Kulit Batang Cempedak (*Artocarpus champeden* Spreng). *Majalah Farmasi Airlangga* **5**(3).
- Mursito B. 2002. *Ramuan Tradisional untuk Penyakit Malaria*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Nuri, Dachlan YP, Santosa MH, Zaini NC, Widayanti & Sjafruddin. 2005. Aktivitas Antimalaria Ekstrak Diklorometana Kulit Batang *Artocarpus champeden* pada Kulit *Plasmodium falciparum*. *Majalah Farmasi Airlangga*, Vol **5** (3).
- Purwadaksi. 2007. *Pemanfaatan Pekarangan untuk Tanaman Obat Keluarga*. Jakarta. AgroMedia.
- Ridley RG. 2002. Medicinal Needs, Scientific Opportunity and The Drive for Antimalaria Drugs. *J. Nature* **417**: 686-693.
- Rukmana HR. 1995. *Pepaya*. Seri Budi Daya, Yogyakarta, Kanisius.
- Santoso HB. 1998. *Tanaman Obat Keluarga*, Toga 2, Yogyakarta: Kanisius.
- Sukardiman & Ekasari W. 2006. Uji Anti Kanker dan Induksi Apoptosis Fraksi Kloroform dari Daun Pepaya (*Carica papaya*) Terhadap Kultur Sel Kanker. *Penelitian Kesehatan* no **24**. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Tietze HW. 1997. *Tempi Pepaya, buah Terapi Makanan yang Aman dan Murah*. Jakarta: Prestasi PustakaRaya.
- Trager W & Jensen JB. 1976. Human Malaria Parasites in Continuous Culture. *Science*: **19**.